

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-115985

(43) 公開日 平成7年(1995)5月9日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 17/02		7432-4B		
A 6 1 K 31/335	A B J	9454-4C		
	A D D	9454-4C		
C 0 7 D 303/48				
// (C 1 2 P 17/02				

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

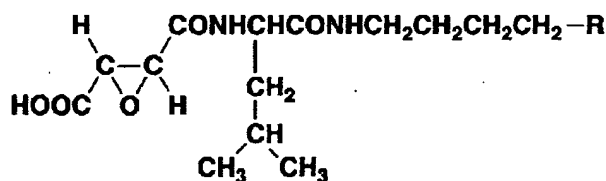
(21) 出願番号	特願平5-266830	(71) 出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22) 出願日	平成5年(1993)10月26日	(72) 発明者	森下 篤機 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭 化成工業株式会社内
		(72) 発明者	伊藤 泰信 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭 化成工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 生理活性物質AM4299、それらの製法ならびに用途

(57) 【要約】

【化1】

【構成】 下記一般式(1)



(1)

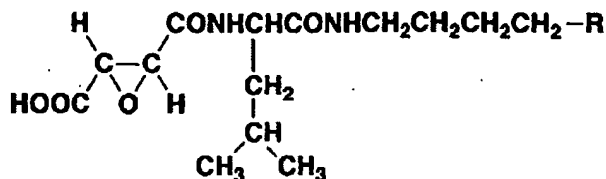
〔式中、Rは-CH<sub>2</sub>OHまたは-CH(NH<sub>2</sub>)COOHで表される基を示す。〕で示される生理活性物質AM4299またはそれらの無毒性塩、クロモロスポリウム属に属する一般式(1)で示される生理活性物質AM4299生産菌を培地に培養し、次いで培養物から該生理活性物質AM4299を採取することを特徴とする該生理活性物質AM4299の製法、ならびに一般式(1)で示される生理活性物質AM4299またはそれらの無

毒性塩を有効成分とする骨疾患の予防または治療剤。

【効果】 新規なチオールプロテアーゼ阻害活性を有するAM4299A物質およびAM4299B物質ならびにそれらの無毒性塩を提供するもので、これらの物質は悪性体液性高カルシウム血症、骨ページェット病および骨粗鬆症等の骨疾患、さらに続発性副甲状腺機能亢進症に伴う骨疾患の予防または抑制しうるもので、種々の骨疾患の予防または治療剤として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)

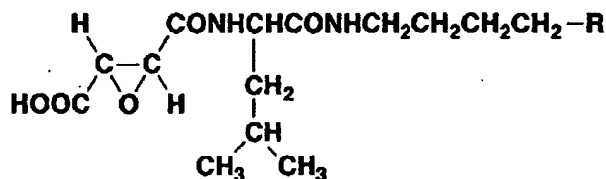


(1)

〔式中、Rは $-\text{CH}_2\text{OH}$ または $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ で表される基を示す。〕で示される生理活性物質AM4299またはそれらの無毒性塩。

【請求項2】 クロメロスポリウム属に属する下記一般式(1)

【化2】



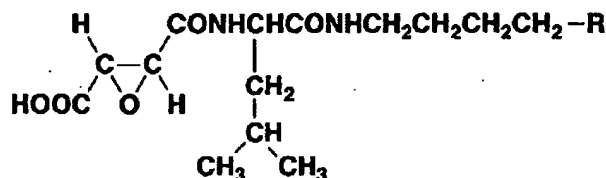
(1)

〔式中、Rは $-\text{CH}_2\text{OH}$ または $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ で表される基を示す。〕で示される生理活性物質AM4299生産菌を培地に培養し、次いで培養物から該生理活性物質AM4299を採取することを特徴とする該生理活性物質AM4299の製法。

【請求項3】 微生物がクロメロスポリウム・フルブムM4299(FERM P-13825)である請求項2記載の生理活性物質AM4299の製法。

【請求項4】 下記一般式(1)

【化3】



(1)

〔式中、Rは $-\text{CH}_2\text{OH}$ または $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ で表される基を示す。〕で示される生理活性物質AM4299またはそれらの無毒性塩を有効成分とする骨疾患の予防または治療剤。

【請求項5】 骨疾患が、悪性高カルシウム血症、骨ペーজেット病または骨粗鬆症である請求項4記載の予防または治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、クロメロスポリウム(Chromelosporium)属に属する微生物が生産するチオールプロテアーゼ阻害活性を有する生理活性物質AM4299またはそれらの無毒性塩、それらの製造法、さらにはそれらを有効成分とする骨疾患の予防または治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、チオールプロテアーゼを特異的に阻害する活性を有する物質としては、微生物によって生産されるE-64(Agric. Biol. Chem. 42: 523-528, 197

8), Thiolstatin (Agric. Biol. Chem. 49: 895-897, 1985), Estatins (J. Antibiotics. 42: 1362-1369, 1989) などが知られている。また合成的手法により得られたものとしては、E-64物質の誘導体など(特開昭52-31024号公報、特開昭53-108923号公報、特開昭54-141734号公報、特開昭55-35012号公報、特開平2-304075号公報)が知られている。

【0003】 近年、高齢者人口の増加と共に老人病が増加している。中でも骨粗鬆症をはじめとする骨疾患は骨折を多発し、寝たきり老人につながる疾病として、その予防と治療法の開発が望まれている。骨は常に造られては壊され、骨形成と骨吸収のバランスの上にその構造および量は維持されている。従って、加齢あるいはその他の原因によりそのバランスが崩れると、種々の骨疾患を発症する。骨吸収の異常亢進によって起こる疾患としては、骨髄腫やリンパ腫などが原因で起こる悪性高カルシウム血症、局所性骨吸収によりもたらされる骨ペーজেット病、加齢により骨重量が減少する骨粗鬆症などが挙

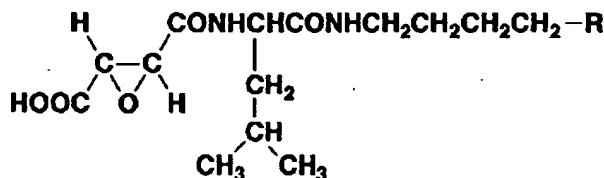
【０００４】骨は主にコラーゲン線維とカルシウム塩からなり、この両者が結びついて強固な骨が形成される。とりわけカルシウム塩は全骨重量の７０％を占めるが、骨疾患においてはその進行と共にカルシウム塩が骨から血液中に溶けだして徐々に失われる。このような疾患の予防または治療には、これまでカルシウムを補うかあるいは維持する療法が採用され、活性型ビタミンD<sub>3</sub>製剤およびカルシウム製剤などが用いられてきた。また骨からの脱灰を抑制する目的でエストロゲン製剤およびカルシトニン製剤のようなホルモン剤が用いられてきた。

に用いることが提案されている（特開昭63-284127号公報、特開平2-218610号公報）。しかしながら、実用的な治療剤の提供には至っていない。

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病および骨粗鬆症や続発性副甲状腺機能亢進症に伴う骨吸収性疾患の予防または治療に有用な新規チオールプロテアーゼ阻害物質を提供することにある。より詳細には、骨吸収性疾患において、カルシウムを補給または維持する従来の療法に代えて、骨中のカルシウム塩の減少を抑制すると同時に、コラーゲン線維の減少も抑制して、より効果的な予防および治療を可能とする骨疾患治療剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため各方面から検討した結果、本発明者らは、安全性の面から天然物に着目し、微生物の醗酵生産物に注目するに至り、各種微生物を検索した結果、沖縄県西表島で採取した山林土壌サンプルから新たに分離した糸状菌M429株が培養液中に目的物質を蓄積することを発見した。そして更にこれらの物質についてその理化学的性質を詳細に研究した結果、従来未知の新規物質であることを確認し、下記一般式(1)

【化4】



(1)

AM4222A物質の理化学的性質

(a) 物質の色及び状態

白色粉末

(b) 比旋光度

$$[\alpha]_D^{22} + 14.6^\circ \quad (c = 0.5, \text{H}_2\text{O})$$

(c) 分子式

$$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_6 \text{ N}_2$$

(d) FAB-MS

$m/z$  331 (M+H)<sup>+</sup>

### (e) 元素分析

計算値 (%) ( $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_6 \cdot \text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  に対して) : C, 49.17; H, 8.25; N, 7.65  
 実測値 (%) C, 49.38; H, 7.96; N, 7.91

(f) 溶解性

水、ジメチルスルホキシド、酢酸、ピリジンに可溶；ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに不溶性。

(g) 呈色反応

ヨウ素蒸気反応、過マンガン酸カリウム脱色反応に陽性を示し、塩化第二鉄反応、ニンヒドリン反応、モーリッシュ反応に陰性を示す。

(h) R<sub>f</sub> 値

約0.24 メルク社製、Kieselgel 60F<sub>254</sub> 使用

展開溶媒：クロロホルム／メタノール／酢酸（5：2：0.1）

(i) 紫外外部吸収スペクトル（100γ/mlとして蒸留水に溶解）

末端吸収を示す。

(j) 赤外部吸収スペクトル（KBrによる。図1に示す。）

有意なシグナルは次のとおりである。

【0012】3400、1640、1560、1390、900 cm<sup>-1</sup>付近。

(k) <sup>1</sup>H-NMRスペクトル（400MHz、D<sub>2</sub>O）

ケミカルシフトは次のとおりである。

0.89（3H, d, J=6.4Hz）、0.93（3H, d, J=6.4Hz）、1.33（2H, m）、1.50-1.58（4H, m）、1.60-1.68（3H, m）、3.21（2H, m）、3.43（1H, d, J=2.4Hz）、3.57（1H, d, J=2.4Hz）、3.59（2H, t, J=6.8Hz）、4.31（1H, t, J=5.6Hz）

(l) <sup>13</sup>C-NMRスペクトル（270MHz、D<sub>2</sub>O）

ケミカルシフトは次のとおりである。

【0013】175.0（s）、174.7（s）、170.7（s）、62.6（t）、55.3（d）、53.8（d）、53.7（d）、40.8（t）、40.1（t）、31.8（t）、29.0（t）、25.3（d）、23.3（q）、23.0（t）、21.7（q）

(m) アミノ酸分析（6N HCl、105°C、18時間加水分解）

ロイシン

#### AM4299B物質の理化学的性質

(a) 物質の色及び状態

白色粉末

(b) 比旋光度

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup> -7.2°（c=0.5、H<sub>2</sub>O）

(c) 分子式

C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

(d) FAB-MS

m/z 375（M+H）<sup>+</sup>

(e) 元素分析

計算値（%）（C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>・H<sub>2</sub>Oに対して）：  
C, 46.94；H, 7.63；N, 10.26

実測値（%） C, 47.14；H, 7.75；N, 10.72

(f) 溶解性

水、ジメチルスルホキシド、酢酸、ピリジンに可溶；ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに不溶性。

(g) 呈色反応

ヨウ素蒸気反応、過マンガン酸カリウム脱色反応、ニンヒドリン反応に陽性を示し、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応に陰性を示す。

(h) R<sub>f</sub> 値

約0.19 メルク社製 Kieselgel 60F<sub>254</sub> 使用

展開溶媒：クロロホルム／メタノール／酢酸（5：5：0.5）

(i) 紫外外部吸収スペクトル（100γ/mlとして蒸留水に溶解）

末端吸収を示す。

(j) 赤外部吸収スペクトル（KBrによる。図2に示す。）

有意なシグナルは次のとおりである。

【0014】3400、1649、1560、1390、900 cm<sup>-1</sup>付近

(k) <sup>1</sup>H-NMRスペクトル（400MHz、D<sub>2</sub>O）

ケミカルシフトは次のとおりである。

0.90（3H, d, J=5.4Hz）、0.94（3H, d, J=5.4Hz）、1.40（2H, m）、1.53-1.67（5H, m）、1.88（2H, m）、3.23（2H, m）、3.45（1H, d）、3.59（1H, d）、3.74（1H, t, J=6.1Hz）、4.32（1H, t, J=4.9Hz）

(l) <sup>13</sup>C-NMRスペクトル（270MHz、D<sub>2</sub>O）

ケミカルシフトは次のとおりである。

【0015】175.6（s）、175.1（s）、174.6（s）、170.7（s）、55.6（d）、55.3（d）、53.9（d）、53.7（d）、40.8（t）、39.9（t）、31.0（t）、29.0（t）、25.4（t）、23.1（q）、22.8（t）、21.7（q）

(m) アミノ酸分析（6N HCl、105°C、18時間加水分解）

ロイシン、リジン

また、本発明に係わるAM4299A物質ならびにAM4299B物質は、上記した理化学的性質からみてペプチドの性状を示しているが、その構造解析を試みた結果、下記的一般式（1）で示される化学構造式を得た。

【0016】

【化5】



#### 参考文献

- 1) Hennebert, G. L. 1973. Botrytis and Botrytis-like genera. Persoonia 7: 183-204
- 2) Hennebert, G. L. and Korf, R. P. 1975. The peat mold, Chromelosporium mollare, conidial state of Peziza ostracoderma, and its misapplied names, Botrytis crystallina, Botrytis spectabilis, Ostracoderma epigaeum and Peziza atrovinosa. Mycologia 67: 214-240.

本発明の生理活性物質AM4299の生産は、上記に挙げた特定の微生物の使用に限定されるものではないことを理解すべきである。本発明は記載の微生物からX線照射、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロログアニジン、2-アミノプリン等の変異処理により取得できる人工変異株ならびに自然変異株を含めて生理活性物質AM4299物質を生産しうる全ての変異株の使用をも包含するものである。

【0025】本発明に係わる生理活性物質AM4299物質は、クロメロスポリウム属に属する該物質生産菌、例えば、クロメロスポリウム・フルブム (C. fulvum) M4299株を資化しうる炭素および窒素源を含む栄養培地中に接種し、好気的条件下例えば、振盪培養、通気攪拌培養等で培養することにより生産せしめることができる。

【0026】炭素源としては、グルコース、デキストリン、シュクロース、フラクトース、マルトース、グリセリン、澱粉、糖蜜等の炭水化物を使用するのが好ましい。窒素源としては、大豆粉、綿実粉、コーンステイプリカー、肉エキスを、落花生粉、ペプトン、小麦胚芽、酵母エキス、オートミール、グルテンミール、魚粉等を使用するのが好ましいが、アンモニウム塩、例えば硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等や尿素、アミノ酸等の無機及び有機の窒素化合物も有利に使用することができる。

【0027】これらの炭素源及び窒素源は、併用するのが有利であるが、純粋なものを必ずしも使用する必要はない。不純なものには、生長因子や微量元素が含まれている場合などもあり、有利な場合があるからである。必要がある場合には、例えば次のような無機塩類を培地に添加してもよい：塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、マグネシウム塩、銅塩、コバルト塩、鉄塩、亜鉛塩、マンガン塩等。

【0028】培養にあたり、発泡の激しい時には、必要に応じて液体パラフィン、動物油、植物油、鉱物油、シリコン等を添加してもよい。目的物質を大量に工業生産するには、他の醗酵生産物の場合と同様に、通気攪拌培養するのが好ましい。少量生産の場合は、フラスコを用いる振盪培養が好適である。

【0029】培養を大きなタンクで行う場合、生理活性

物質AM4299の生産工程において菌の生育遅延を防止するため、はじめに比較的少量の培地に生産菌を接種培養した後、次に培養物を大きな生産タンクに移して、そこで生産培養するのが好ましい。この場合、前培養に使用する培地及び生産培養に使用する培地の組成は、両者とも同一であってもよいし必要あれば両者を変えてもよい。

【0030】培養は通気攪拌条件で行うのが好ましく、例えばプロペラやその他機械による攪拌、ファーマンターの回転または振盪、ポンプ処理、空気の吹き込み等既知の方法が適宜使用される。通気用の空気は滅菌したものをを用いる。培養温度は、本生理活性物質AM4299生産菌が本物質を生産する範囲内で適宜変更しうるが、通常は12-39℃、好ましくは28℃前後で培養するのがよい。培養pHは、通常は3.5-9.8、好ましくはpH7前後で培養するのがよい。培養時間は、培養条件や培養量によっても異なるが通常は約1日-1週間である。

【0031】培養物から目的とする生理活性物質AM4299を採取する方法としては、例えば、水、有機溶媒、これらの混合溶媒による抽出；イオン交換樹脂法又は吸着若しくは分配クロマトグラフィー；シリカゲルクロマトグラフィー；単一溶媒又は混合溶媒からの再結晶等常法が適宜単独あるいは組み合わせで使用できる。生理活性物質AM4299の回収、精製は上記のように既知の方法を適宜利用して行うが、例えば次のようにしてもよい。培養により生成した生理活性物質AM4299は主として培養液中に分泌される水溶性物質であるので、一般には遠心分離、濾過等の手段により菌体を除去した上清あるいは濾液を例えば活性炭、合成吸着樹脂等を使用する吸着クロマトグラフィー、各種イオン交換樹脂等を使用するイオン交換クロマトグラフィーを使用することにより、生理活性物質AM4299を含む粗物質を採取することができる。更に精製するにはシリカゲル、アルミナ等を使用する吸着カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過法、各種イオン交換ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、オクタデシル化されたシリカゲルを担体とする逆相分配カラムクロマトグラフィー及びHPLC、更には向流分配法、結晶、再結晶化等の精製手段を順次又は適宜組み合わせで行うことにより精製できる。また生理活性物質AM4299は酸性または両性物質であり、塩基または酸と反応して無毒性塩を形成することができる。生理活性物質AM4299の塩基との塩としてはナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土金属塩、アンモニウム塩などが挙げられ、酸との塩としては、塩酸塩、硫酸塩等の酸付加塩が挙げられる。

【0032】本発明の製剤は、有効成分として用いられる生理活性物質AM4299としては、AM4299A物質、AM4299B物質及びそれらの無毒性塩のうち

いずれか一種であっても、それらの混合物であってもよく、生理活性物質4299物質を例えば、直腸投与、経鼻ないしバツカル吸入等の経肺、点鼻、点眼、外用、経口または皮下、静脈内および筋肉内を含む非経口などの投与または吸入に適した有機あるいは無機担体または賦形剤と共に含有する固型、半固型あるいは液状の製剤の形で用いることができる。有効成分は例えば、錠剤、ペレット剤、トローチ、カプセル剤、坐剤、クリーム剤、軟膏剤、エアゾール剤、吸入用粉末剤、液剤、乳剤、懸濁剤、その他使用に適した剤形に用いられる慣用の無毒性の医薬として許容される担体と共に配合することができる。さらに、必要に応じて補助剤、安定化剤、粘調化剤、着色剤および香料を使用することができる。生理活性物質AM4299またはその無毒性塩は疾患の経過または状態に所望の治療効果を生じるに足る量を製剤に含有させればよい。

【0033】この製剤を人に適用する場合、静脈内、筋肉内または経口投与によるのが好ましい。有効成分の治療有効量は治療される各患者の年齢および条件によって変動するが、一般に有効成分を、静脈内投与の場合には人の体重1kg当たり1日量0.01-30mg、筋肉内投与の場合には人の体重1kg当たり1日量0.1-30mg、経口投与の場合には人の体重1kg当たり1日量0.5-50mgで骨疾患の予防または治療のために投与することができる。本発明に係わる生理活性物質AM4299物質及び/又はその塩が対象とする疾患とは、骨吸収性疾患を意味するもので骨疾患の予防または治療剤であって、具体的には、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病、骨粗鬆症が例示される。

#### 【0034】

【実施例】次に実施例によって本発明をさらに説明するが、本発明の範囲はこれらのみに限定されるものではない。

#### 【0035】

##### 【実施例1】

##### 生理活性物質AM4299の醗酵生産

グルコース1%、デキストリン1%、イーストエキス0.5%、カゼイン水解物0.5%、CaCO<sub>3</sub>0.1%、セライト1%からなる前培養培地（滅菌前pH7.0）を500ml容三角フラスコに100mlずつ分注し、115℃で15分間滅菌した。この各々の培地にクロモスポリウム・フルブム（*C. fulvum*）M4299株（FERM P-13825）の斜面培養物を一白金耳ずつ接種し、ロータリーシェーカー（毎分200回転）で26℃、72時間培養した。次にグルコース2%、ペプトン1%、コンスティープリカー1%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.2%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O0.1%、FS-アンチフォーム（Dow Corning K.K.社製）0.02%からなる本培養培地（pH6.5）を調整し、この本培養培地20Lを30L容ジャーファーマンターに注入し

た。これを120℃で20分間滅菌した後、先に得た前培養物を0.5%接種し、26℃で4日間培養した。攪拌は200rpm、通気量は20L/分で行った。

#### 【0036】生理活性物質AM4299の検定

本発明の生理活性物質AM4299はチオールプロテアーゼを阻害する活性を有するため、この作用に基づいて定量が可能であり、培養液からの生理活性物質AM4299の回収、精製などの目的に利用することができる。検定方法を以下に示す。

【0037】1mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）および2.7mMシステイン含有100mM酢酸緩衝液（pH5.0）0.5ml、カテプシンL溶液50μl（酵素量0.5μg；Nova-Boichem社製）あるいは、カテプシンB溶液50μl（酵素量0.0125unit；Sigma社製）に各種濃度の生理活性物質AM4299の25μlを加えた反応液を26℃で5分間ブレインキュベーションした。ついで2mgのNα-CBZ-L-lysine-p-nitrophenyl ester（Sigma社製）を1mlのメタノールに溶解した基質溶液25μlを反応液に加え26℃で30分間インキュベーションを行った。反応は、0.1N塩酸0.5mlを反応液に加えることにより停止させた。本反応液の326nmにおける吸光度（S）を測定した。同様に反応液に阻害剤を加えないでインキュベーションした時の326nmにおける吸光度（B）を測定し、次式によって阻害（%）を求めた。阻害（%）=100x（B-S）/B

#### 【0038】生理活性物質AM4299の吸着、精製

上記の培養方法で得られた培養物80L（4バッチ合計）を6N塩酸でpH6.5に調整し、濾過により菌体を除去した培養濾液75Lを得た。その濾液を予め作製した5Lのカーボンカラム（φ10×100cm）に付した。30Lの水でカラムを洗浄した後、50%アセトン水10Lで目的物質を溶出した。上記で得た溶出液を減圧下で約500mlまで濃縮し、pHを6.5に修正した後、アンバーライトIR-120B（Rohm & Haas社製；H<sup>+</sup>型）2Lのカラム（φ7.6×50cm）にチャージし、水2Lで目的物質を溶出し、溶出液を減圧下で約200mlまで濃縮した。次に、その濃縮液をpH8に調整し、300mlのDEAE-Sephadex（Pharmacia社製；Cl<sup>-</sup>型）カラム（φ3.6×40cm）にチャージした。1Lの水でカラムを洗浄した後、1.3Lの水と1.3Lの0.2M塩化ナトリウム水溶液で直線濃度勾配溶出を行い、20mlずつ分画を行って、目的物質はフラクションNo.54-No.72に溶出された。この溶出画分を集め、脱塩のために200mlのカーボンカラム（φ3.2×40cm）にチャージし、1Lの水でカラムを洗浄後、pH9のアンモニア性50%アセトン水溶液700mlで目的物質を溶出した。

【0039】次いで溶出液を減圧下濃縮し、約5mlとした溶液にシリカゲル粉末5gを加えてよく攪拌混合し、減圧下水分を除去した。このシリカゲル粉末を予め酢酸エチル-メタノール-濃アンモニア水(5:5:0.2)の混合溶媒にて作製した200mlのシリカゲルカラム( $\phi$ 3.2×40cm)にチャージし、同混合溶媒にて溶出を行い、20mlずつ分画した。フラクションNo.72-No.168にAM4299A物質が溶出され、これらの画分を集めて減圧濃縮して、AM4299A物質のアンモニウム塩が白色粉末として69mg得られた。またフラクションNo.211-No.284にAM4299B物質が溶出され、これらの画分を集めて減圧濃縮して、AM4299B物質のアンモニウム塩が白色粉末として45mg得られた。

【0040】上記で得たAM4299A物質のアンモニウム塩69mgを3mlの水に溶解し、120mlのCM-Sephadex C-25(Pharmacia社製;H<sup>+</sup>型)カラム( $\phi$ 2.0×40cm)にチャージし、水で溶出を行い20mlずつ分画した。フラクションNo.13-No.31にAM4299A物質は溶出された。これらの画分を集めて減圧濃縮し、200mlのSephadex G-15(Pharmacia社製)カラム( $\phi$ 2.0×50cm)にチャージし、水で溶出を行い3mlずつ分画を行った。フラクションNo.19-No.30を集め減圧濃縮、凍結乾燥することにより、AM4299A物質の遊離体の白色粉末を55mg得た。

【0041】同様に上記で得たAM4299B物質のアンモニウム塩45mgを3mlの水に溶解し、120mlのCM-Sephadex C-25(H<sup>+</sup>型)カラム( $\phi$ 2.0×40cm)にチャージし、水で溶出を行い20mlずつ分画した。フラクションNo.23-No.32にAM4299B物質は溶出された。これらの画分を集めて減圧濃縮し、200mlのSephadex G-15カラム( $\phi$ 2.0×50cm)にチャージし、水で溶出を行い、3mlずつ分画を行った。フラクションNo.19-No.25を集め減圧濃縮、凍結乾燥することにより、AM4299B物質の遊離体の白色粉末を34mg得た。

【0042】

## 【実施例2】

### 生理活性物質AM4299のチオールプロテアーゼ阻害作用

生理活性物質AM4299についてチオールプロテアーゼの一種である人腎臓由来のカテプシンLおよび牛脾臓由来のカテプシンBの活性を50%阻害する濃度(IC<sub>50</sub>値)を求めた。その結果、AM4299A物質のカテプシンL及びカテプシンBに対するIC<sub>50</sub>値はそれぞれ0.029 $\mu$ g/ml、0.024 $\mu$ g/mlであった。またAM4299B物質のカテプシンL及びカテプシンBに対するIC<sub>50</sub>値はそれぞれ0.090 $\mu$ g/ml、0.049 $\mu$ g/mlであった。

### 【0043】PTHrp(1-34)により惹起されたラットの高カルシウム血症に対する本発明の予防および治療剤の効果

PTH-related protein(PTHrp; Science, 237:893(1987)、J. Biol. Chem., 264:14806(1989)、Calcif. Tiss. Int., 36:563(1984))は、人の悪性体液性高カルシウム血症惹起因子として同定された蛋白質である。本物質の活性型フラグメントであるPTHrp(1-34)は、ラットに投与すると高カルシウム血症を引き起こし、またイン・ビトロで骨吸収亢進作用が示されているので(J. Clinical Investigation, 81: 596-600, 1988; Endocrinology, 123: 2841-2884, 1988)、骨粗鬆症のモデルを組み立てるために用いられた。

【0044】24時間前に甲状腺と副甲状腺を摘出したウイスター系ラット(5週齢、雄、70-90g、一群5匹)にAM4299AまたはAM4299B物質を10mg/kgおよび20mg/kg体重の用量で経口投与し、4時間後にPTHrp(1-34)を1.5nmole/kg静脈内投与した。PTHrp(1-34)投与1時間後に採血し、血中カルシウム濃度を原子吸光法で測定した。その結果は表1に示す通りであり、本発明に係わるAM4299A物質およびAM4299B物質の10mg/kgおよび20mg/kg投与群は、血中カルシウム濃度の上昇を有意に抑制した。

【0045】

【表1】



# 高カルシウム血症に対する AM4299 の効果

群	TPTX 処理	PTHrp 処理	薬物	投与量 (mg/kg)	Ca 濃度 (mg/dl)
1.	なし	なし	なし	0	10.6 ± 0.3
2.	あり	なし	なし	0	5.0 ± 0.3
3.	あり	あり	なし	0	6.9 ± 0.3
4.	あり	あり	AM4299A	10	6.2 ± 0.2*
5.	あり	あり	AM4299A	20	5.7 ± 0.2*
6.	あり	あり	AM4299B	10	6.3 ± 0.3*
7.	あり	あり	AM4299B	20	5.8 ± 0.2*

血中カルシウム濃度平均値 ± S.D. (n = 5)

\* : P < 0.05 vs 第三群の血中カルシウム濃度

【0046】この結果は、本発明に係わるAM4299 A物質及びAM4299 B物質が悪性体液性高カルシウム血症を予防または抑制しうることを示し、本発明の生理活性物質AM4299が骨疾患の予防または治療剤として有用であることが明らかになった。

## 続発性副甲状腺機能亢進症に対する本発明の効果

ラットにカルシウム欠乏食を与えると副甲状腺ホルモン (PTH) 放出量の増加と続発性副甲状腺機能亢進症とが発症する。このモデルにおいて血中カルシウムの大半は骨から溶出したものである。正常範囲内に、血中カルシウム濃度を維持するため、放出されるPTHによって骨再吸収が促進される。

【0047】このモデルは、続発性副甲状腺機能亢進症ラットにおける生理活性物質AM4299の効果を調べ

るために用いられた。ウィスター系ラット (5週齢、雄、70-90g、一群5匹) を5日間カルシウム欠乏食で飼育した。一夜絶食後、AM4299 A物質またはAM4299 B物質を10mg/kgおよび20mg/kg体重の用量で経口投与し、血中カルシウム濃度を薬剤投与5時間後に、採血し、原子吸光法で測定した。

【0048】その結果は表2に示す通りであり、AM4299 A物質およびAM4299 B物質の10mg/kgおよび20mg/kg投与群において血中カルシウム濃度を有意に低下させ、本発明の生理活性物質AM4299は、続発性副甲状腺機能亢進症を伴う骨疾患の予防または治療にも有用であることが確認された。

【0049】

【表2】

## 続発性副甲状腺機能亢進に対する AM4299 の効果

群	薬物	投与量 (mg/kg)	Ca 濃度 (mg/dl)
1.	なし	0	10.7 ± 0.2
2.	AM4299A	10	10.0 ± 0.2*
3.	AM4299A	20	9.4 ± 0.2*
4.	AM4299B	10	10.1 ± 0.2*
5.	AM4299B	20	9.5 ± 0.2*

血中カルシウム濃度平均値 ± S.D. (n = 5)

\* : P < 0.05 vs 第一群の血中カルシウム濃度

## 【0050】急性毒性試験

生後5週齢のICR系雌マウス各5匹に、AM4299 A物質またはAM4299 B物質を200mg/kg体重、静脈内注射したが、死亡例はなく、体重増加も無投与マウス群と全く同じであり、AM4299 A物質及びAM4299 B物質の安全性の高さが確認された。

【0051】

【実施例3】

実施例1で製造したAM4299 A物質 5g

バレイショ・澱粉 9g

ステアリン酸マグネシウム 1g

以上を搗潰機でよく混和した後、1号ゼラチンハードカプセルに150mgずつ充填し、1カプセル中50mgのAM4299 A物質を含有するカプセル剤を得た。また、同様に、AM4299 B物質を含有するカプセル剤を得た。

【0052】

【実施例4】

実施例1で製造したAM4299B物質 5g

食塩 9g

炭酸水素ナトリウム 1g

以上を蒸留水200mlに溶解した後、アンプルに1mlずつ分注して、1アンプル中25mgのAM4299B物質を含有する注射剤を製造した。また、同様にして、AM4299A物質を含有する注射剤を製造した。

【0053】

【発明の効果】本発明は、AM4299A物質およびAM4299B物質ならびにそれらの無毒性塩を提供するもので、これらの物質は従来未知の新規チオールプロテアーゼ阻害物質であって、悪性体液性高カルシウム血

症、骨ページェット病および骨粗鬆症等の骨疾患、さらに続発性副甲状腺機能亢進症に伴う骨疾患の予防または抑制しうることが確認され、種々の骨疾患の予防または治療剤として有用である。

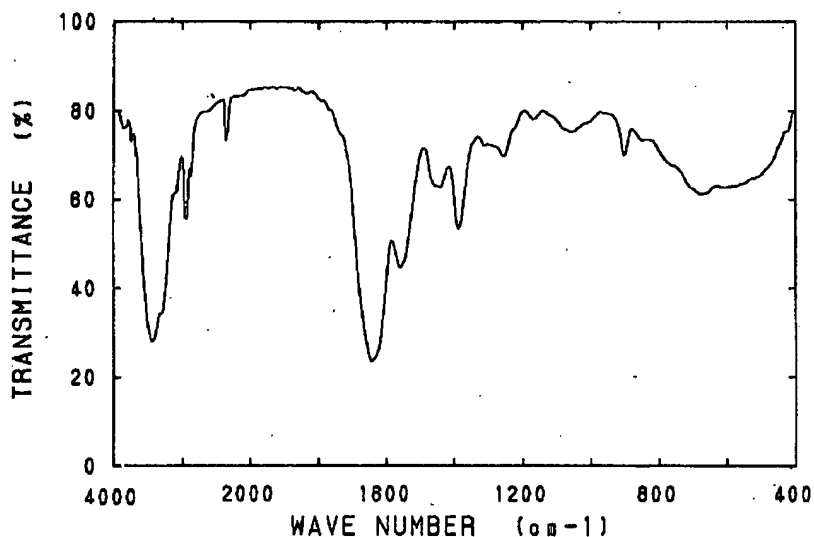
【0054】また本発明に係わる有効成分の構造が明らかにされたので、微生物による工業的製造のほかに有機合成による製造も可能となり、その結果各種誘導体の製造も可能となるので、新規化合物の製造及び新規用途の開発も大いに期待できる。

【図面の簡単な説明】

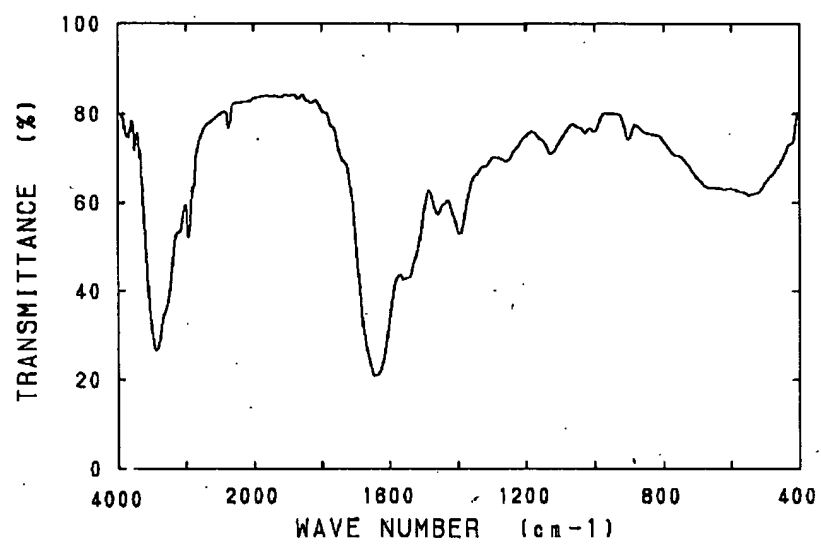
【図1】図1はAM4299A物質のKBr錠剤中での赤外部吸収スペクトルの図を示す。

【図2】図2はAM4299B物質のKBr錠剤中での赤外部吸収スペクトルの図を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 R 1:645)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所